印楝素 A 与印楝素 B 对粉纹夜蛾 BTI-Tn-5B1-4 的细胞毒性

黄星艳，李文欧，张志祥，徐汉虹*
（华南农业大学天然农药与化学生物学教育部重点实验室/昆虫毒理研究室，广州 510642）

摘要：为了明确印楝素 A 和 B 活性差异的机理，本研究比较了印楝素 A 和印楝素 B 对粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* 离体培养胚胎细胞系 BTI-Tn-5B1-4 的毒性。结果表明：印楝素 A 与印楝素 B 对 BTI-Tn-5B1-4 细胞具有良好的增殖抑制活性，处理后 3 d，其 IC_{50}值分别为 2.09 μg/mL 和 9.85 μg/mL，印楝素 A 的细胞毒力显著高于印楝素 B。倒置显微镜观察发现，印楝素 A 和印楝素 B 处理可导致细胞变形，贴壁能力下降，并出现明显空泡，印楝素 A 的影响明显高于印楝素 B。流式细胞仪检测结果表明，印楝素可导致 BTI-Tn-5B1-4 细胞体积显著膨大，印楝素 A 处理细胞体积增大程度显著高于印楝素 B；印楝素可以明显影响 BTI-Tn-5B1-4 细胞膜电位，1.25 μg/mL 印楝素 A 和印楝素 B 处理后 3 d，细胞 DiBAC4(3)荧光强度分别增加 88.12% 和 55.37%，印楝素 A 的影响显著高于印楝素 B。荧光显微镜观察发现，印楝素对 BTI-Tn-5B1-4 细胞核具有明显影响，印楝素 B 的影响明显高于印楝素 A，印楝素 B 处理后，细胞核受损细胞数更多，受损程度更严重。结果显示印楝素 A 和印楝素 B 的细胞作用机理存在差异，本研究从细胞学水平解释了印楝素的生长发育抑制作用机理。

关键词：印楝素 A；印楝素 B；粉纹夜蛾胚胎细胞系；细胞毒性；流式细胞仪
中图分类号：Q965.9 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2010)06-0664-06

Toxicity of azadirachtin A and azadirachtin B on *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) BTI-Tn-5B1-4 cells

HUANG Xing-Yan, LI Wen-Ou, ZHANG Zhi-Xiang, XU Han-Hong* (Key Laboratory of Natural Pesticide and Chemical Biology, Ministry of Education/Laboratory of Insect Toxicology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: To clear the mechanism of activity differences of azadirachtin A and azadirachtin B, the toxicities of azadirachtin A and azadirachtin B on *Trichoplusia ni* BTI-Tn-5B1-4 cell line were compared. The results showed that both azadirachtin A and azadirachtin B had excellent inhibitory effect on BTI-Tn-5B1-4 cell proliferation. After *T. ni* BTI-Tn-5B1-4 cells were treated with azadirachtin A and azadirachtin B for 3 d, their IC_{50} values were 2.09 μg/mL and 9.85 μg/mL, respectively, suggesting that the toxicity of azadirachtin A was greater than that of azadirachtin B. Under inverted microscope, it was found that both azadirachtin A and azadirachtin B could induce cell deformation, adhesion capacity reduction and vacuole appearance, and azadirachtin A showed obviously greater effect than azadirachtin B. Azadirachtin treated-cells were commonly bigger than the control, and the cells treated with azadirachtin A were bigger than those with azadirachtin B through flow cytometry analysis. Azadirachtin can also change membrane potential of BTI-Tn-5B1-4 cells. After BTI-Tn-5B1-4 cells were treated for 3 d, $DiBAC_4(3)$ fluorescence intensity in azadirachtin A and azadirachtin B-treated cells was 88.12% and 55.37%, respectively, showing that azadirachtin A had greater effect than azadirachtin B. Under fluorescence microscope, it was found that azadirachtin could influence cell nucleus, and azadirachtin B affected more remarkably than azadirachtin A, based on the results that the amount of cells with damaged-nucleus treated with azadirachtin B was larger, and damage in cell nucleus was more severe. The results suggest that there exists mechanism difference between azadirachtin A and azadirachtin B, and provide the clues to explain the mechanism of azadirachtin that inhibits insect growth at the cell level.

基金项目：广东省教育部产学研结合项目(2006D90204003)；农业部行业计划项目(200903052)；广东省农业领域重点项目(2009A020102003)

作者简介：黄星艳，女，1982 年生，贵州黔南人，硕士研究生，研究方向为昆虫毒理，E-mail：huangxingyan424@163.com
* 通讯作者 Corresponding author, Tel.: 020-85285127; E-mail: hhxu@scau.edu.cn

收稿日期 Received: 2010-01-30；接受日期 Accepted: 2010-04-26

Key words：Azadirachtin A；azadirachtin B；*Trichoplusia ni* BTI-Tn-5B1-4 cell line；cell toxicity；flow cytometry

印楝 *Azadirachta indica* 是楝科楝属乔木，广泛种植于热带、亚热带地区，原产于印度次大陆(徐汉虹，2001)。印楝素是从印楝种子中分离提纯而来的柠檬素类化合物，属四环三萜类物质，对许多昆虫具有拒食、胃毒及抑制生长发育的作用(李晓东和赵善欢，1995；徐汉虹，2001)，被广泛用于防治棉花、蔬菜、果树、茶叶和水稻上害虫，尤以防治鳞翅目、鞘翅目和双翅目等害虫效果较好，并且对人畜低毒(Reed and Majumdar，1998；Salehzadeh *et al.*，2002)，是一种高效、低残留及高选择性的无公害生物农药，符合当前害虫综合治理与农业可持续发展需求。

印楝素 A 和印楝素 B 是印楝素杀虫剂中的主要活性成分，印楝素 B 的含量一般为印楝素 A 的 1/3 ~ 1/2。印楝素干粉和印楝种子甲醇抽提物中印楝素 A 和印楝素 B 在甲醇和甲醇 + 水中或直接热贮均易降解，且印楝素 A 降解率高于印楝素 B，印楝素 B 的稳定性高于印楝素 A(张志祥等，2005)。印楝素 B 对棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 幼虫的拒食活性及对小菜蛾 *Plutella xylostella* (L.)和斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 幼虫的毒杀活性明显低于印楝素 A，而对斜纹夜蛾幼虫体重和蛹的影响明显高于印楝素 A(张志祥等，2004，2007)。国内外以活虫为对象，对印楝素的杀虫作用机理进行了较为系统的研究(程东美等，2007)，但对其生长发育抑制作用研究主要集中在作用结果上，如印楝素导致的昆虫体重及体内生理指标的变化上，而对其机理研究不够深入。

为了探讨印楝素对害虫的生长发育抑制作用机理，明确印楝素 A 和 B 活性差异的机理，研究了印楝素对粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* 离体培养胚胎细胞系 BTI-Tn-5B1-4 细胞增殖抑制作用和作用机理，为进一步阐明印楝素作用机理提供了理论依据，而且通过对印楝素 A 和印楝素 B 对害虫细胞毒性的比较，还能了解类似化合物官能团的改变与杀虫活性差异之间的联系，为筛选化合物或农药活性成分分子设计提供参考，也为研究印楝素 A 和印楝素 B 的作用差异提供了参考。

1　材料与方法

1.1　供试细胞

BTI-Tn-5B1-4 细胞系为粉纹夜蛾 *Trichoplusia ni* 胚胎细胞，即 Hi-5 细胞系，由华南农业大学昆虫毒理研究室传代培养。培养基为 Grace's Insect Culture Medium (Gibco 公司)，添加 10% 胎牛血清 (Gibco 公司)，27.5℃恒温培养。

1.2　供试药剂及仪器

印楝素 A (azadirachtin A，Aza A)，纯度为 96.7%，华南农业大学天然农药与化学生物学教育部重点实验室分离制备。

印楝素 B (azadirachtin B，Aza B)，纯度为 95.6%，华南农业大学天然农药与化学生物学教育部重点实验室分离制备。

药剂用二甲基亚砜(DMSO)溶解，用培养基稀释，保持 DMSO 最终浓度为 0.1% (v/v)。

DG-3022 型酶联免疫检测仪，上海国营华东电子管厂；XD101 型倒置相差显微镜，江苏南京光电(集团)股份有限公司；FACS Calibur 流式细胞仪，美国 Becton Dickinson (BD)公司；荧光显微镜，Olympus 公司。

1.3　印楝素 A 和印楝素 B 对 BTI-Tn-5B1-4 细胞的增殖抑制作用

参考张志祥等 (2000)方法，采用 MTT 法研究印楝素 A 和印楝素 B 对 BTI-Tn-5B1-4 细胞的增殖抑制作用。以 0.1% DMSO 培养基为对照，药剂处理浓度为 0.625，1.25，2.5，5 和 10 μg/mL，每处理设 4 次重复。药后 2 d 更换一次含药培养基，处理组药剂浓度不变。以酶联免疫检测仪，在 490 nm下，于药后 3 d 检测细胞存活情况。

1.4　倒置显微观察印楝素 A 和印楝素 B 对 BTI-Tn-5B1-4 细胞整体形态影响

参考 Freshney (2004) 方法，于细胞培养皿 (Φ = 6 cm)正中放入洁净盖玻片，将 2 mL 对数生长期的 BTI-Tn-5B1-4 细胞(密度约为 3×10^5 个/mL)悬液接种于皿中，24 h 后更换 1.25 μg/mL 印楝素 A 和印楝素 B，对照更换含 0.1% DMSO 培养基，药后 2 d 更换一次含药培养基，处理组药剂浓度不变。3 d 后取出盖玻片，在倒置相差显微镜下观察，记录细胞整体形态变化。

1.5　流式细胞仪检测印楝素 A 和印楝素 B 对 BTI-Tn-5B1-4 细胞体积的影响

参考于洋等(2006)方法。以 1.25 μg/mL 印楝素 A 和印楝素 B 处理对数生长期细胞，对照为

0.1% DMSO 培养基。药后 3 d 收集细胞，PBS 清洗 3 次，上流式细胞仪检测和分析。应用 488 nm 的氩离子气体激光器，细胞体积大小以前向角散射光(foreword scatter，FSC)参数表征。每处理设 3 次重复，药后 2 d 换一次培养液，处理浓度不变。

1.6 流式细胞仪测印楝素 A 和印楝素 B 对 BTI-Tn-5B1-4 细胞膜电位的影响

参考陈建庭等(2004)方法，细胞培养及处理方法同 1.5。3 d 后收集细胞，PBS 清洗 3 次，加入浓度为 5 μmol/L 的荧光染料 $DiBAC_4(3)$ 500 μL，27℃避光孵育 30 min，以流式细胞仪检测荧光强度。每处理设 3 次重复，药后 2 d 换一次培养液，处理浓度不变。

1.7 印楝素 A 和印楝素 B 对 BTI-Tn-5B1-4 细胞细胞核的影响

参考张卓然(2004)方法。细胞培养及处理方法同 1.4，盖玻片经 PBS 漂洗 3 次，95% 乙醇固定 5 min。充分干燥后，室温下 0.01% 吖啶橙(AO)染色液避光染色 5 min，PBS 清洗，加盖玻片临时封固后荧光显微镜下(选用紫蓝色激发滤片)观察。

1.8 数据统计与分析

毒力回归、方差分析均采用 SAS 数据软件分析，用邓肯氏新复极差法(Duncan's multiple range test，DMRT)进行差异显著性分析。细胞大小和细胞膜电位检测用 Cell Quest(美国 BD 公司)软件分析。

2 结果与分析

2.1 印楝素 A 和印楝素 B 对 BTI-Tn-5B1-4 细胞的增殖抑制作用

本实验采用 MTT 法，比较测定了印楝素 A 与印楝素 B 对 BTI-Tn-5B1-4 细胞的增殖抑制作用，结果见表 1。

从表 1 可以看出，印楝素 A 与印楝素 B 对 BTI-Tn-5B1-4 细胞具有良好的增殖抑制作用。印楝素 A 和印楝素 B 处理后 3 d，对 BTI-Tn-5B1-4 细胞的 IC_{50} 值分别为 2.09 μg/mL 和 9.85 μg/mL，从置信区间可以看出，印楝素 A 对细胞的抑制作用显著高于印楝素 B。

表 1 印楝素 A 与印楝素 B 对粉纹夜蛾 BTI-Tn-5B1-4 细胞的增殖抑制作用比较

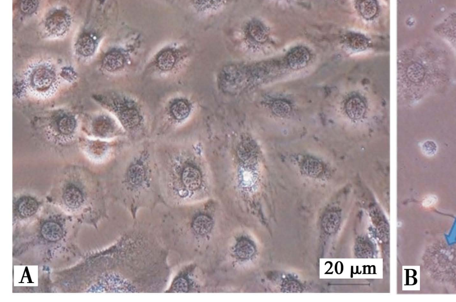
Table 1 Comparison of growth inhibition effect of azadirachtin A and azadirachtin B on *Trichoplusia ni* BTI-Tn-5B1-4 cells

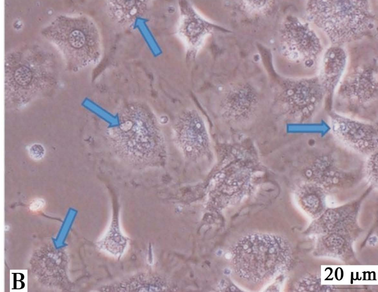
处理 Treatment	毒力回归方程 Toxicity regression equation	IC_{50} (μg/mL) (95% CL)	相关系数 Correlation coefficient
印楝素 A Azadirachtin A	$y = 4.6573 + 1.0705x$	2.09 (1.63 – 2.69)	0.9826
印楝素 B Azadirachtin B	$y = 4.5702 + 0.4327x$	9.85 (3.53 – 17.46)	0.9971

2.2 印楝素 A 和印楝素 B 对 BTI-Tn-5B1-4 细胞形态的影响

本实验采用倒置相差显微镜，观察比较了印楝素 A 和印楝素 B 对 BTI-Tn-5B1-4 细胞形态的影响，结果见图 1。

从图 1 可看出，印楝素 A 和印楝素 B 可以明显改变 BTI-Tn-5B1-4 细胞的形态。倒置显微镜下，对照细胞形态规则，生长状态良好，细胞长势一致，排列紧密，大部分呈梭形，且贴壁紧密(图 1: A)；印楝素 A 处理后，细胞贴壁松散变形，不规





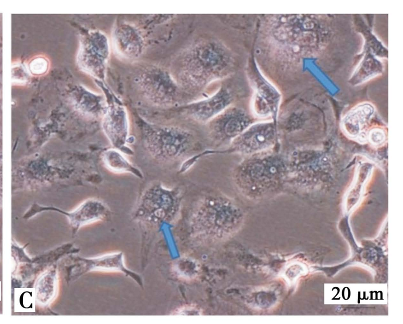


图 1 印楝素处理后粉纹夜蛾 BTI-Tn-5B1-4 细胞的形态变化(×400)

Fig. 1 Morphological changes of azadirachtin treated *Trichoplusia ni* BTI-Tn-5B1-4 cells (×400)

A：对照细胞 Control cells；B：经 1.25 μg/mL 印楝素 A 处理 3 d 的细胞 Cells treated with 1.25 μg/mL azadirachtin A for 3 d；C：经 1.25 μg/mL 印楝素 B 处理 3 d 的细胞 Cells treated with 1.25 μg/mL azadirachtin B for 3 d；箭头示细胞空泡 Cell vacuoles in arrows.

则，呈膨大状态，空泡化严重，并有碎片产生(图 1：B)。印楝素 B 处理后，细胞脱壁严重，形态不规则，部分细胞出现空泡，但空泡化不及印楝素 A 处理细胞(图 1：C)。

2.3　印楝素 A 和印楝素 B 处理 BTI-Tn-5B1-4 细胞体积变化比较

倒置显微镜观察结果表明，印楝素可使 BTI-Tn-5B1-4 细胞膨胀，为了进一步明确印楝素 A 和印楝素 B 对 BTI-Tn-5B1-4 细胞形态的影响，本实验采用流式细胞仪研究了印楝素 A 和印楝素 B 对 BTI-Tn-5B1-4 细胞体积的影响，结果见图 2。

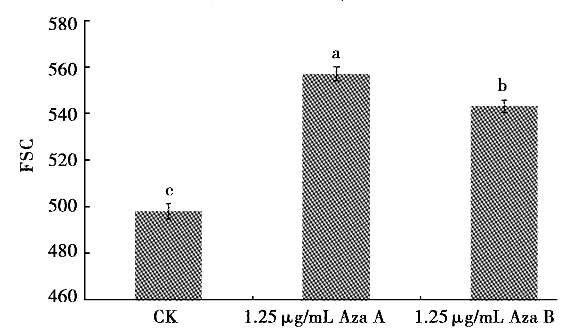


图 2　印楝素 A 和印楝素 B 对粉纹夜蛾 BTI-Tn-5B1-4 细胞体积的影响

Fig. 2　Effect of azadirachtin A and azadirachtin B on volume of *Trichoplusia ni* BTI-Tn-5B1-4 cells

CK：0.1% DMSO.

从图 2 可见，印楝素 A 和印楝素 B 可导致 BTI-Tn-5B1-4 细胞体积显著膨大。1.25 μg/mL 印楝素 A 和印楝素 B 处理 BTI-Tn-5B1-4 细胞 3 d 后，平均 FSC 参数值分别为 557 ± 3.05 和 543 ± 2.64，与对照细胞(平均 FSC 参数值为 498 ± 3.21)比较，差异极显著($P < 0.01$)。FSC 参数值表征细胞体积大小，说明印楝素 A 和印楝素 B 处理的细胞体积增大。印楝素 A 对细胞体积的影响显著高于印楝素 B($P < 0.05$)。

2.4　印楝素 A 和印楝素 B 对 BTI-Tn-5B1-4 细胞膜电位的影响

本实验采用流式细胞仪研究了印楝素 A 和印楝素 B 对 BTI-Tn-5B1-4 细胞膜电位的影响，结果见图 3。

从图 3 可以看出，印楝素 A 和印楝素 B 对细胞膜电位具有明显影响。1.25 μg/mL 印楝素 A、印楝素 B 及对照处理细胞 3 d 后，细胞内 $DiBAC_4$(3)平均荧光强度值分别为 259.81 ± 2.62，214.58 ± 2.14 和 128.11 ± 2.06，三者差异极显著($P < 0.01$)。印楝素 A 和印楝素 B 处理后，荧光强度峰位置右移，平均荧光强度增加率分别为 88.12%

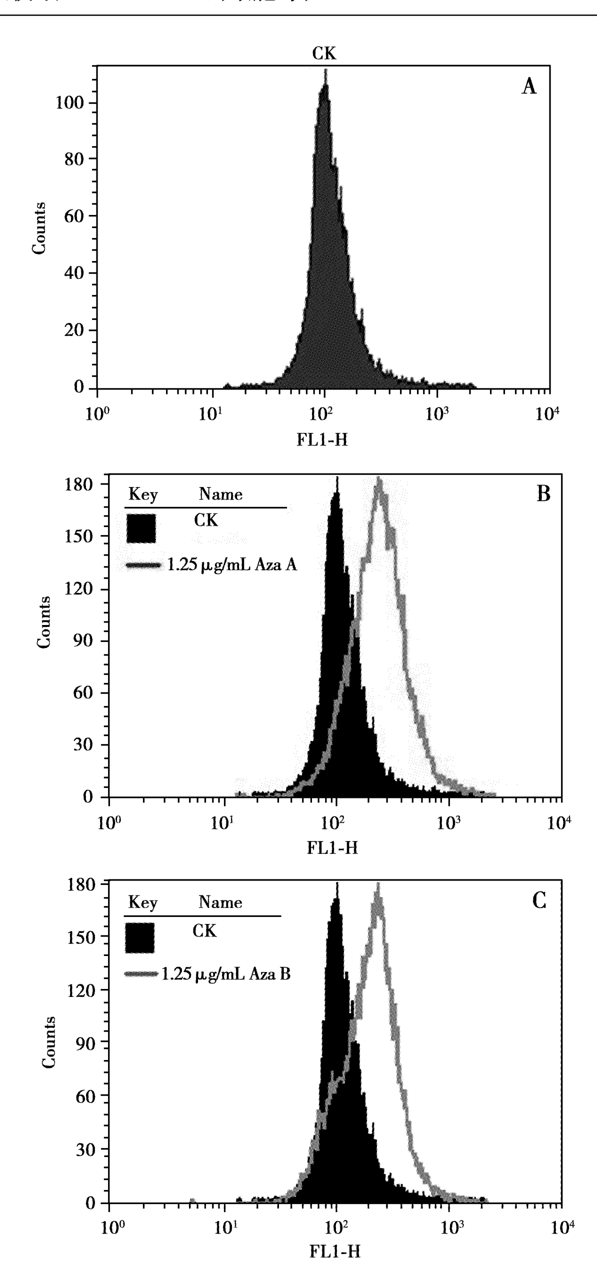


图 3　印楝素对粉纹夜蛾 BTI-Tn-5B1-4 细胞膜电位的影响

Fig. 3　Effect of azadirachtin on membrane potential of *Trichoplusia ni* BTI-Tn-5B1-4 cells

A：对照细胞 Control cells；B：经 1.25 μg/mL 印楝素 A 处理 3 d 的细胞 Cells treated with 1.25 μg/mL azadirachtin A for 3 d；C：经 1.25 μg/mL 印楝素 B 处理 3 d 的细胞 Cells treated with 1.25 μg/mL azadirachtin B for 3 d.

和 55.37%，表明细胞膜电位负值减小，细胞膜发生去极化，印楝素 A 处理细胞较印楝素 B 处理细胞去极化程度更显著。

2.5　印楝素 A 和印楝素 B 对 BTI-Tn-5B1-4 细胞核的影响

本实验采用 AO 染色，在荧光显微镜下观察比较了印楝素 A 和印楝素 B 对 BTI-Tn-5B1-4 细胞核形态的影响，结果见图 4。

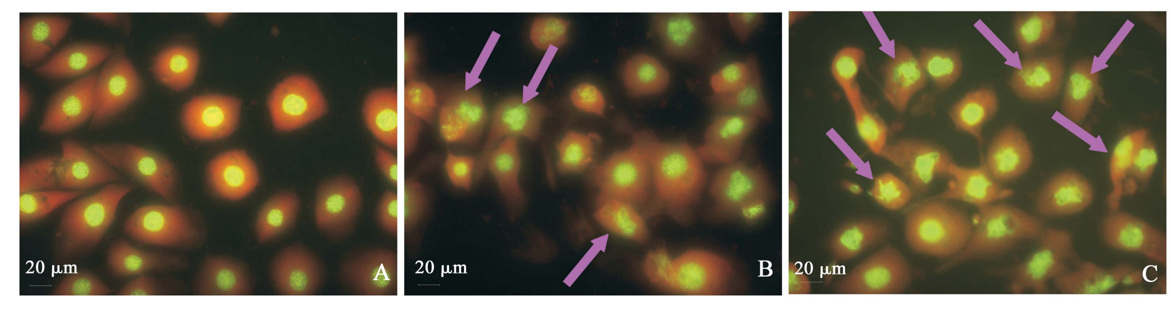


图 4 印楝素对粉纹夜蛾 BTI-Tn-5B1-4 细胞核的影响(×400)

Fig. 4 Effect of azadirachtin on nucleus of *Trichoplusia ni* BTI-Tn-5B1-4 cells (×400)

A：对照细胞 Control cells；B：经 1.25 μg/mL 印楝素 A 处理 3 d 的细胞 Cells treated with 1.25 μg/mL azadirachtin A for 3 d；C：经 1.25 μg/mL 印楝素 B 处理 3 d 的细胞 Cells treated with 1.25 μg/mL azadirachtin B for 3 d. 箭头示异常细胞 Arrows indicate abnormal cells.

1.25 μg/mL 印楝素 A 和印楝素 B 可显著影响 BTI-Tn-5B1-4 细胞核形态(图 4)。在荧光显微镜下观察到对照组的细胞核为均匀的黄绿色荧光，呈规则圆形，边缘光滑，细胞质呈浅桔红荧光，细胞形态完整(图 4：A)。印楝素 A 处理细胞的细胞质桔红色荧光不清晰，有小部分碎片，部分细胞核呈不均匀黄绿色荧光，边缘不光滑，成破碎状(图 4：B)。印楝素 B 处理细胞的细胞质桔红色荧光不清晰，很多细胞核呈不均匀黄绿色荧光，不呈规则圆形，核受损细胞显著多于印楝素 A 处理组，且受损程度更严重(图 4：C)。

3 讨论

本研究以 BTI-Tn-5B1-4 细胞为对象，测定了印楝素 A 和印楝素 B 对粉纹夜蛾 BTI-Tn-5B1-4 的细胞毒性。研究表明，印楝素 A 和印楝素 B 对 BTI-Tn-5B1-4 细胞具有明显的增殖抑制作用，可改变细胞形态，影响细胞骨架结构，使细胞不能正常贴壁，体积增大，并使细胞膜电位去极化，其中，印楝素 A 的影响明显高于印楝素 B；同时，印楝素可显著影响 BTI-Tn-5B1-4 细胞核形态，但印楝素 B 的影响明显高于印楝素 A。

印楝素对细胞的增殖抑制作用可能是其影响害虫生长发育的重要原因。细胞是构成昆虫的基本单位，是昆虫进行物质与能量交流的重要场所，细胞的衰弱和死亡直接影响到昆虫的生命活动(彩万志等，2001)。如当昆虫体内血细胞数量降低时，昆虫体重显著降低，体内血糖含量和蛋白质含量显著降低，直至昆虫死亡(张瑞峰等，2007)。细胞含量降低与昆虫生长发育及昆虫死亡之间的关系，与印楝素对细胞的增殖抑制作用具有良好的相关性。

印楝素对细胞形态及骨架结构的影响可解释印楝素导致昆虫体内组织肿大的原因，如印楝素可导致前胸腺等组织肿大(李晓东和赵善欢，1995)。本研究表明，印楝素可导致 BTI-Tn-5B1-4 细胞膨大及细胞变形。印楝素 A 作用于微管蛋白和微丝蛋白(Salehzadeh *et al*., 2003；Anuradha and Annadurai，2008)，从而影响细胞正常生长和形态、粘附等。印楝素 B 处理的细胞也同样出现变形膨大，不能正常贴壁生长现象，表明印楝素 B 可能对细胞微管和微丝系统也有影响。也表明纺缍丝(由微管蛋白组成)将受到影响，进而可直接影响细胞的有丝分裂过程，即细胞没有相对强度的形态，且使染色体复制后不能正常分离，导致细胞膨大，进而使昆虫组织和器官肿大，从而影响组织器官的正常功能，如前胸腺肿大后导致的激素分泌异常，导致昆虫变态过程异常等。

细胞膜电位是反映细胞生命活力和功能的一个良好指标。印楝素使 BTI-Tn-5B1-4 细胞膜电位改变，产生去极化变化，导致了胞内外离子的穿膜运动，打破了维持细胞正常生命活动的离子分布的平衡状态，从而引起细胞产生不利于其存活的生理和生化状态的改变，进而影响组织器官的功能。

细胞核是重要的功能单位，含有完整的遗传物质，从根本上控制着细胞的生命，细胞核还是合成 mRNA 的场所，控制着细胞内蛋白质的合成。真核细胞细胞核受到影响，将直接影响细胞的增殖甚至直接导致细胞死亡(翟中和等，2000)，从而影响细胞构成的组织的功能。因此，印楝素对细胞核的影响可能是影响害虫生长发育的原因之一。

在活体拒食活性和生长发育抑制作用中，印楝素 A 的活性显著高于印楝素 B(张志祥等，2007)，在离体细胞增殖抑制作用、细胞形态影响和细胞膜电位影响中，印楝素 A 的影响也均大于印楝素 B，这与活性测定结果正相关，表明印楝素 A 和印楝

素 B 的作用机理具有一致性，但在对细胞核的影响中，印楝素 B 的影响显著高于印楝素 A，印楝素 B 处理细胞核破损率更大，破损程度也更严重(图 2)。这表明印楝素 A 和印楝素 B 的作用机理具有差异性，在对细胞核的影响上，印楝素可能具有新的作用机理，该机理有待于进一步研究。印楝素 B 和印楝素 A 的结构相似，只是丁烯酯键位置的差异及环氧环构上“-H”和“-OH”的不同，印楝素 A 环氧环上是“-OH”，而印楝素 B 上的是“-H”(张志祥等，2007)，环氧环构上“-H”和“-OH”的导致两者稳定性及对昆虫的活性差异，这也可能是导致两者细胞毒性和毒理差异的原因。印楝素杀虫剂中，印楝素 B 的含量仅次于印楝素 A，是其重要活性成分之一。本实验在细胞学水平上研究了印楝素的生长发育抑制作用机理，进一步深化了印楝素的杀虫作用机理，研究了印楝素 A 和印楝素 B 在细胞毒性上的差异，为印楝素杀虫剂的进一步研究和应用提供了理论参考。

参 考 文 献 (References)

Anuradha A, Annadurai RS, 2008. Biochemical and molecular evidence of azadirachtin binding to insect actins. *Current Science*, 95 (11): 1588 – 1593.

Cai WZ, Pang XF, Hua BZ, Liang GW, Song DL, 2001. General Entomology. China Agricultural University Press, Beijing. 124 – 126. [彩万志，庞雄飞，花保祯，梁广文，宋敦伦，2001. 普通昆虫学. 北京：中国农业大学出版社. 124 – 126]

Chen JT, Tan XY, Yang CL, Tang HZ, Jin DD, 2004. Influence of pulsed electric-magnetic field on cell membrane potential and calcium ions of osteoblast in the osteoblast-osteoclast co-culture system. *Chinese Journal of Clinical Rehabilitation*, 8(5): 870 – 872. [陈建庭，谭小云，杨春露，唐焕章，金大地，2004. 脉冲电磁场对成骨细胞-破骨细胞复合培养体系中成骨细胞膜电位及细胞内钙离子的影响. 中国临床康复，8(5): 870 – 872]

Cheng DM, Zhang ZX, Tian YQ, Xu HH, Jiang DX, 2007. Insecticidal mechanism of azadirachta indica. *Plant Protection*, 33(4): 11 – 15. [程东美，张志祥，田永清，徐汉虹，江定心，2007. 印楝杀虫作用机理. 植物保护，33(4): 11 – 15]

Freshney RI, 2004. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique. 4th ed. Science Press, Beijing. 274 – 275. [Freshney RI, 2004. 动物细胞培养——基本技术指南(第四版). 北京：科学出版社. 274 – 275]

Li XD, Zhao SH, 1995. The toxic effects and mode of azadirachtin on insects. *Journal of South China Agricultural University*, 17(1): 118 – 122. [李晓东，赵善欢，1995. 印楝素对昆虫的毒理作用机制. 华南农业大学学报，17(1): 118 – 122]

Reed E, Majumdar SK, 1998. Differential cytotoxic effects of azadirachtin on *Spodoptera frugiperda* and mouse cultured cells. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 89: 215 – 221.

Salehzadeh A, Akhkha A, Cushley W, Adams RLP, Kusel JR, Strang RHC, 2003. The antimitotic effect of the neem terpenoid azadirachtin on cultured insect cells. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33: 681 – 689.

Salehzadeh A, Jabbar A, Jennens L, Ley SV, Annadurai RS, Adams R, Strang RHC, 2002. The effects of phytochemical pesticides on the growth of cultured invertebrate and vertebrate cells. *Pest Management Science*, 58: 268 – 276.

Xu HH, 2001. Insecticidal Plants and Botanical Insecticides. China Agriculture Press, Beijing. 159 – 184. [徐汉虹，2001. 杀虫植物与植物性杀虫剂. 北京：中国农业出版社. 159 – 184]

Yu Y, Kong FX, Shi XL, 2006. Relationship of heterogeneous sensitivity to metal ion and its cell cycle in *Scenedesmus obliquus*. *Environmental Science*, 6(27): 1197 – 1200. [于洋，孔繁翔，史小丽，2006. 栅藻对金属离子的异质敏感性与其细胞周期的关系. 环境科学，6(27): 1197 – 1200]

Zhai ZH, Wang XZ, Ding MX, 2000. Cell Biology. Higher Education Press, Beijing. 247 – 248. [翟中和，王喜忠，丁明孝，2000. 细胞生物学. 北京：高等教育出版社. 247 – 248]

Zhang RF, Ren YX, Xu HH, Zhang ZX, 2007. Bioactivities of fungicides against *Spodoptera litura* cells and larvae. *Acta Entonologica Sinica*, 50(7): 689 – 694. [张瑞峰，任永霞，徐汉虹，张志祥，2007. 杀菌剂对斜纹夜蛾 SL 细胞系和幼虫的生物活性. 昆虫学报，50(7): 689 – 694]

Zhang ZR, 2004. Culture Cytology and Technology for Cell Culture. Shanghai Science and Technology Press, Shanghai. 383. [张卓然，2004. 培养细胞学细胞培养技术. 上海：上海科学技术出版社. 383]

Zhang ZX, Cheng DM, Xu HH, 2007. A comparative study on the bioactivity of azadirachtin A and azadirachtin B. *Plant Protection*, 33(3): 80 – 82. [张志祥，程东美，徐汉虹，2007. 印楝素 A 和印楝素 B 生物活性比较. 植物保护，33(3): 80 – 82]

Zhang ZX, Cheng DM, Xu HH, Tian YQ, Yang XY, 2004. Bioactivity and synergism of azadirachtin A and azadirachtin B. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 23(5): 515 – 518. [张志祥，程东美，徐汉虹，田永清，杨晓云，2004. 印楝素 A 和印楝素 B 的生物活性及增效作用. 华中农业大学学报，23(5): 515 – 518]

Zhang ZX, Tian YQ, Cheng DM, Xu HH, Jiang DX, 2005. Stability comparison of azadirachtin A and azadirachtin B. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 28(1): 125 – 127. [张志祥，田永清，程东美，徐汉虹，江定心，2005. 印楝素 A 和印楝素 B 的稳定性比较. 南京农业大学学报，28(1): 125 – 127]

Zhang ZX, Xu HH, Cheng DM, Wu YL, Fan JF, 2000. Screening derivatives of spiro enol ether and testing its toxicity on *Spodoptera litura* cell with MTT method. *Journal of South China Agricultural University*, 21(3): 29 – 32. [张志祥，徐汉虹，程东美，吴毓林，范俊发，2000. 利用 MTT 法以茼蒿素类似物对昆虫细胞毒力筛选及测定. 华南农业大学学报，21(3): 29 – 32]

(责任编辑：赵利辉)